

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102258807 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 30

(21) 申请号 201110199312. 6

(22) 申请日 2011. 07. 15

(71) 申请人 山东大学

地址 250100 山东省济南市历城区山大南路
27 号

(72) 发明人 刘宏 赵洪石 王冠聪 任娜
陈丽梅 李建华 梁小萌 刘铎
江怀东 陶绪堂 王继扬

(74) 专利代理机构 济南金迪知识产权代理有限公司 37219

代理人 许德山

(51) Int. Cl.

A61L 27/36 (2006. 01)

A61L 27/56 (2006. 01)

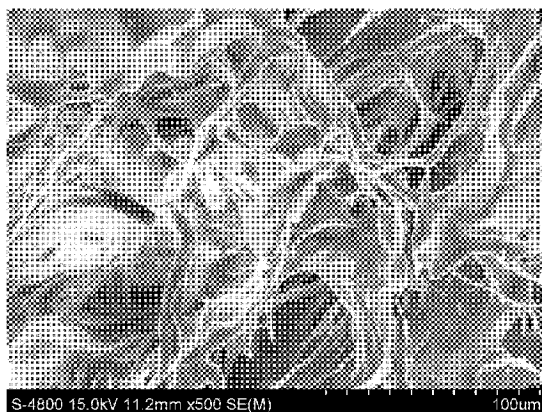
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种组织工程用猪脱细胞真皮基质的调孔方法

(57) 摘要

本发明公开了一种组织工程用猪脱细胞真皮基质 (PADM) 的调孔方法, 是将阴离子生物大分子或阳离子生物大分子加入充分润湿的猪脱细胞真皮基质水溶液中, 通过调节胶原的动电电位即 zeta 电位实现; 其中: 所述阴离子生物大分子为聚天门冬氨酸钠, 所述阳离子生物大分子为水溶性壳聚糖; 所述生物大分子与猪脱细胞真皮基质的重量比例是 1 : 5 ~ 1 : 25。本发明的方法不但有效调节猪脱细胞真皮基质的孔径尺寸, 而且调整胶原束的结构形貌, 得到的猪脱细胞真皮基质保持了胶原的天然结构, 预示这类材料将在修复医学中具有广泛的应用前景。



1. 一种组织工程用猪脱细胞真皮基质 (PADM) 的调孔方法, 是将阴离子生物大分子或阳离子生物大分子加入充分润湿的猪脱细胞真皮基质水溶液中, 通过调节胶原的动电电位即 zeta 电位实现; 其特征在于: 所述阴离子生物大分子为聚天门冬氨酸钠, 所述阳离子生物大分子为水溶性壳聚糖; 所述生物大分子与猪脱细胞真皮基质的重量比例是 1 : 5 ~ 1 : 25。

2. 如权利要求 1 所述组织工程用猪脱细胞真皮基质的调孔方法, 其特征在于: 所述聚天门冬氨酸钠选分子量 2000-3500 道尔顿, 密度 $1.1\text{g}/\text{cm}^3(20^\circ\text{C})$, pH(1%) 为 4-7 的聚天门冬氨酸钠。

3. 如权利要求 1 所述组织工程用猪脱细胞真皮基质的调孔方法, 其特征在于: 所述水溶性壳聚糖选脱乙酰度为 85-87%, 粘度 (1%) 为 30-300mpa. s, pH(1%) 为 4-7 的水溶性壳聚糖。

4. 如权利要求 1 所述组织工程用猪脱细胞真皮基质的调孔方法, 其步骤是:

(1) 称取一定量猪脱细胞真皮基质, 然后按猪脱细胞真皮基质与超纯水为 1 : 100 ~ 1 : 200 的重量比例混合, 然后在恒温摇床中以 80-150 转 / 分的速度, 将猪脱细胞真皮基质支架充分润湿 12-24 小时;

(2) 按生物大分子与猪脱细胞真皮基质的重量比为 1 : 5 ~ 1 : 25 的比例将阴离子生物大分子或阳离子生物大分子溶于上述含有支架的水中, 继续在恒温摇床中以 80-150 转 / 分的速度反应 12-24 小时;

(3) 取出支架, 以去离子水并用速度为 80-130 转 / 分钟的摇床对其洗涤 3-5 次, 每次 30-120 分钟;

(4) 对洗涤后的支架在零下 70°C 条件下进行冷冻, 然后在零下 $50-60^\circ\text{C}$ 下冷冻干燥 12-16 小时, 得孔径为 50-300 微米、孔壁厚为 5-10 微米的片状或松散胶原束结构的猪脱细胞真皮基质支架。

5. 如权利要求 4 所述组织工程用猪脱细胞真皮基质的调孔方法, 其特征在于: 所述猪脱细胞真皮基质与超纯水的重量比选 1 : 120 ~ 1 : 170。

6. 如权利要求 4 所述组织工程用猪脱细胞真皮基质的调孔方法, 其特征在于: 所述生物大分子与猪脱细胞真皮基质的重量比为 1 : 7 ~ 1 : 15。

7. 如权利要求 4 所述组织工程用猪脱细胞真皮基质的调孔方法, 其特征在于: 所述阴离子生物大分子为聚天门冬氨酸钠, 所述阳离子生物大分子为水溶性壳聚糖。

8. 如权利要求 4 所述组织工程用猪脱细胞真皮基质的调孔方法, 其特征在于: 所述洗涤时的摇床速度选 90-120 转 / 分钟, 洗涤时间每次为 45-90 分钟。

一种组织工程用猪脱细胞真皮基质的调孔方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种组织工程用猪脱细胞真皮基质 (PADM) 的调孔方法, 尤其涉及一种用生物大分子调控组织工程用猪脱细胞真皮基质 (PADM) 孔径的方法, 属生物材料领域。

背景技术

[0002] 皮肤及骨修复材料的研制开发一直是组织工程领域大批科学工作者努力的方向。自体移植一直在临床上占主导地位。但自体骨来源有限, 而异体移植又有免疫排斥和感染疾病的危险。人们已经开发各种材料用于皮肤及骨组织工程领域。但是这些材料各有不足, 不能完全达到临床上的要求。由于皮肤和骨中的有机成分都主要是由 I 型胶原构成, 因此胶原基支架材料便成了研究热点。但传统的胶原来源为从鼠尾及牛、马的肌腱中提取而来, 提取过程不仅破坏了胶原的天然结构, 降低了其生物相容性及机械性能, 且提取成本高。

[0003] 组织工程支架材料原理提示一个具有和原组织相似的组成和结构的材料将会有更优异的生物学性能。

[0004] 猪脱细胞真皮基质 (PADM) 主要由 I 型胶原构成, 组成与天然骨及皮肤中有机组成十分相似。它的提取和纯化方法较为成熟, 美国已有部分产品被 FDA 认证并应用于临床 (Permacol, Covedien)。而且它在骨组织工程上的研究也开始引起研究学者们的注意。作为组织工程支架材料, 其孔径尺寸非常重要, 它关系到细胞的迁移、组织的长入和代谢产物及营养物质的运输。传统的控制 PADM 孔形貌及尺寸的方法主要有化学交联剂交联法、机械打孔法和激光造孔法。这些方法都在不同程度上对 PADM 有损伤或改变了其天然的结构, 因此, 开发新的、更实用的组织工程用猪脱细胞真皮基质 (PADM) 的调孔方法势在必行。

发明内容

[0005] 针对现有的 PADM 孔径调控方法中存在的不足, 本发明目的是提出一种用生物大分子调控组织工程用猪脱细胞真皮基质 (PADM) 孔尺寸的方法。

[0006] 本发明所述的组织工程用猪脱细胞真皮基质 (PADM) 的调孔方法, 是将阴离子生物大分子或阳离子生物大分子加入充分润湿的猪脱细胞真皮基质水溶液 ($\text{pH} = 7$) 中, 通过调节胶原的动电电位即 zeta 电位实现; 其特征在于: 所述阴离子生物大分子为聚天门冬氨酸钠, 所述阳离子生物大分子为水溶性壳聚糖; 所述生物大分子与猪脱细胞真皮基质的重量比例是 1 : 5 ~ 1 : 25。

[0007] 其中: 所述聚天门冬氨酸钠选分子量 2000-3500 道尔顿, 密度 $1.1 \text{g}/\text{cm}^3$ (20°C), $\text{pH}(1\%)$ 为 4-7 的聚天门冬氨酸钠; 所述水溶性壳聚糖选脱乙酰度为 85-87%, 粘度 (1%) 为 30-300mpa. s, $\text{pH}(1\%)$ 为 4-7 的水溶性壳聚糖。

[0008] 上述组织工程用猪脱细胞真皮基质的调孔方法, 进一步具体的实施步骤是:

[0009] (1) 称取一定量猪脱细胞真皮基质, 然后按猪脱细胞真皮基质与超纯水为 1 : 100 ~ 1 : 200 的重量比例混合, 然后在恒温摇床中以 80-150 转 / 分的速度, 将猪脱细胞真皮基质支架充分润湿 12-24 小时;

[0010] (2) 按生物大分子与猪脱细胞真皮基质的重量比为 1 : 5 ~ 1 : 25 的比例将阴离子生物大分子或阳离子生物大分子溶于上述含有支架的水中,继续在恒温摇床中以 80-150 转 / 分的速度反应 12-24 小时;

[0011] (3) 取出支架,以去离子水并用速度为 80-130 转 / 分钟的摇床对其洗涤 3-5 次,每次 30-120 分钟;

[0012] (4) 对洗涤后的支架在零下 70℃ 条件下进行冷冻,然后在零下 50-60℃ 下冷冻干燥 12-16 小时,得孔径为 50-300 微米、孔壁厚为 5-10 微米的片状或松散胶原束结构的猪脱细胞真皮基质支架。

[0013] 上述组织工程用猪脱细胞真皮基质的调孔方法中:猪脱细胞真皮基质 (PADM) 是采用中国专利 031390633 所述的方法制备的。

[0014] 上述组织工程用猪脱细胞真皮基质的调孔方法中:所述猪脱细胞真皮基质与超纯水的重量比优选 1 : 120 ~ 1 : 170。

[0015] 上述组织工程用猪脱细胞真皮基质的调孔方法中:所述生物大分子与猪脱细胞真皮基质的重量比优选 1 : 7 ~ 1 : 15。

[0016] 上述组织工程用猪脱细胞真皮基质的调孔方法中:所述阴离子生物大分子为聚天门冬氨酸钠,所述阳离子生物大分子为水溶性壳聚糖。

[0017] 上述组织工程用猪脱细胞真皮基质的调孔方法中:所述洗涤时的摇床速度优选 90-120 转 / 分钟,洗涤时间每次为 45-90 分钟,此步骤即要保证去除残留生物大分子,又要防止支架受到机械破坏。

[0018] 本发明经过试验筛选提出了一种组织工程用猪脱细胞真皮基质 (PADM) 的调孔方法,通过选择生物相容性好、带不同电荷的生物大分子 (如聚天门冬氨酸钠或水溶性壳聚糖) 来调节猪脱细胞真皮基质 (PADM) 胶原分子的动电电位,从而调节胶原束的收缩、溶胀来达到控制孔径的目的,得到具有优异结构和组成的皮肤及骨组织用胶原支架,实验证实:本发明所述猪脱细胞真皮基质支架孔径为 50-300 微米、孔壁厚为 5-10 微米的片状或松散胶原束结构,且所述支架孔径、孔壁厚利用本方法可调,使 PADM 在组织工程上有更广阔的应用前景。总之,本发明的方法不但有效调节猪脱细胞真皮基质的孔径尺寸,而且调整胶原束的结构形貌,得到的猪脱细胞真皮基质保持了胶原的天然结构,预示这类材料将在修复医学中具有重要的临床应用价值和社会效益。

附图说明

[0019] 图 1 壳聚糖调节孔径 100-150 微米的 PADM 多孔支架。

[0020] 图 2 壳聚糖调节孔径 150-300 微米的 PADM 多孔支架。

[0021] 图 3 聚天门冬氨酸钠调节孔径 50-100 微米的 PADM 多孔支架。

[0022] 图 4 聚天门冬氨酸钠调节孔径 100-250 微米的 PADM 多孔支架。

具体实施方式

[0023] 实施例 1:孔径在 100-150 微米的 PADM 天然支架的制备。

[0024] (1) 称取一定量 PADM,然后将其浸入其重量 120 倍的超纯水中,在恒温摇床中以 80 转 / 分的速度,将支架充分润湿 15 小时。

[0025] (2) 准确称量其重量 7% 的壳聚糖溶于含有支架的水中, 继续在恒温摇床中以 120 转 / 分的速度, 反应 12 小时。

[0026] (3) 取出支架, 用去离子水洗涤 3 次, 60 分钟 / 次, 洗涤时摇床速度为 80 转 / 分钟。

[0027] (4) 零下 70℃ 下进行冷冻, 最后在零下 60℃ 冷冻干燥 16 小时。

[0028] 经上述步骤后得到的 PADM 孔径在 100-150 微米, 孔壁厚为 5-10 微米纤维束组成的组织工程用 PADM。

[0029] 实施例 2 : 孔径在 150-300 微米的 PADM 天然支架的制备。

[0030] 同实施例 1, 步骤 (2) 中水溶性壳聚糖的质量为 PADM 重量的 20% ;

[0031] 步骤 (3) 中洗涤时间 5 次。

[0032] 经上述步骤后得到的 PADM 孔径在 150-300 微米, 孔壁由 5-10 微米松散胶原片组成的组织工程用 PADM。

[0033] 实施例 3 : 孔径在 50-100 微米的 PADM 天然支架的制备。

[0034] 同实施例 1, 将水溶性壳聚糖改为聚天门冬氨酸钠 ;

[0035] 步骤 (2) 中聚天门冬氨酸钠的质量为 PADM 重量的 8% ;

[0036] 经上述步骤后得到的 PADM 孔径在 50-100 微米, 孔壁由厚为 30-50 微米的片状胶原组成的组织工程用 PADM 支架。

[0037] 实施例 4 : 孔径在 100-250 微米的 PADM 天然支架的制备。

[0038] 同实施例 1, 将水溶性壳聚糖改为聚天门冬氨酸钠 ;

[0039] 步骤 (2) 中聚天门冬氨酸钠的质量为 PADM 重量的 20% ;

[0040] 步骤 (3) 中洗涤时间 5 次。

[0041] 经上述步骤后得到的 PADM 孔径在 100-250 微米, 孔壁为 10-30 微米松散胶原纤维束组成的组织工程用 PADM。

[0042]

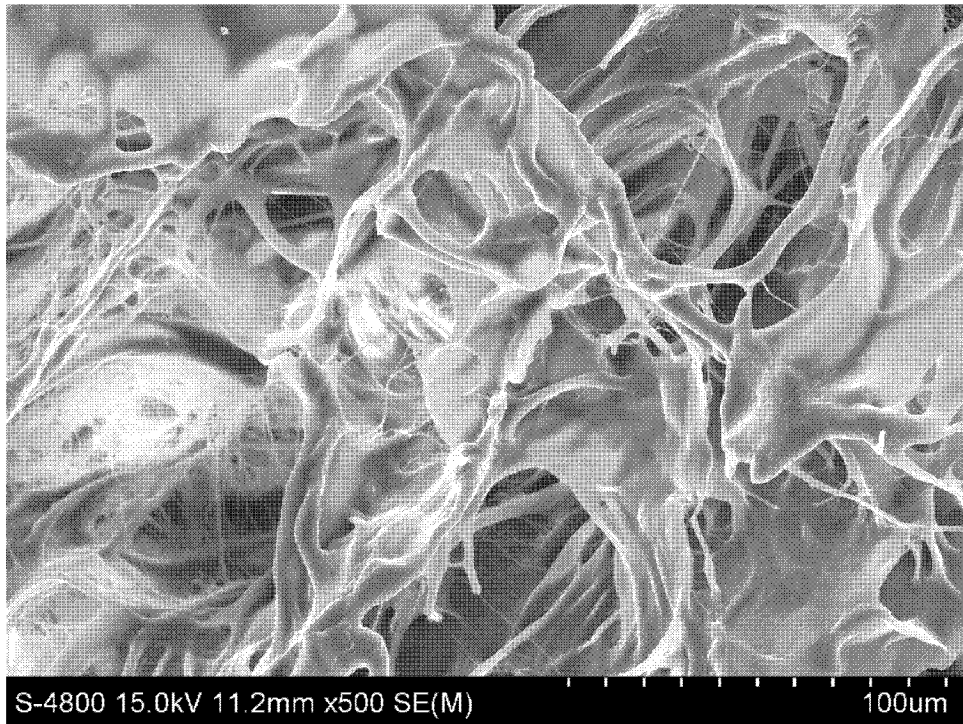


图 1

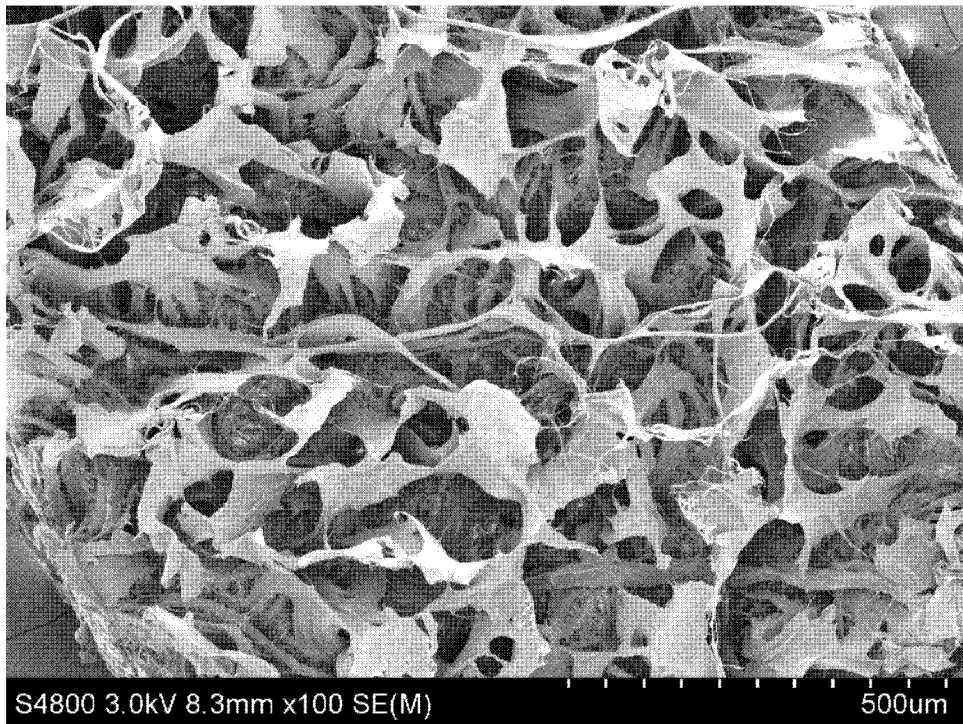


图 2

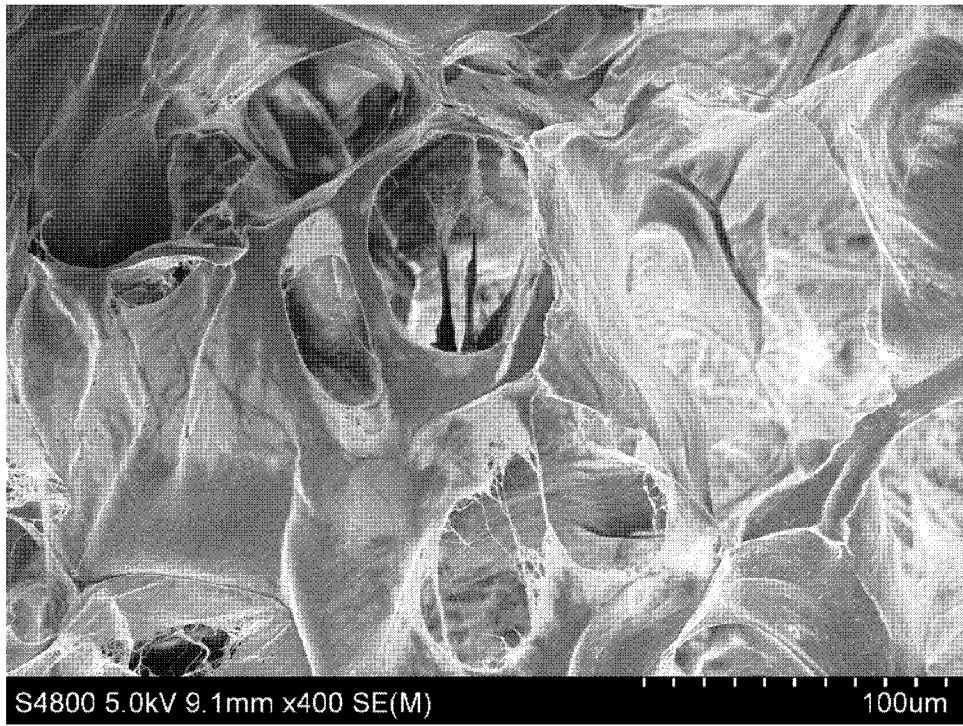


图 3

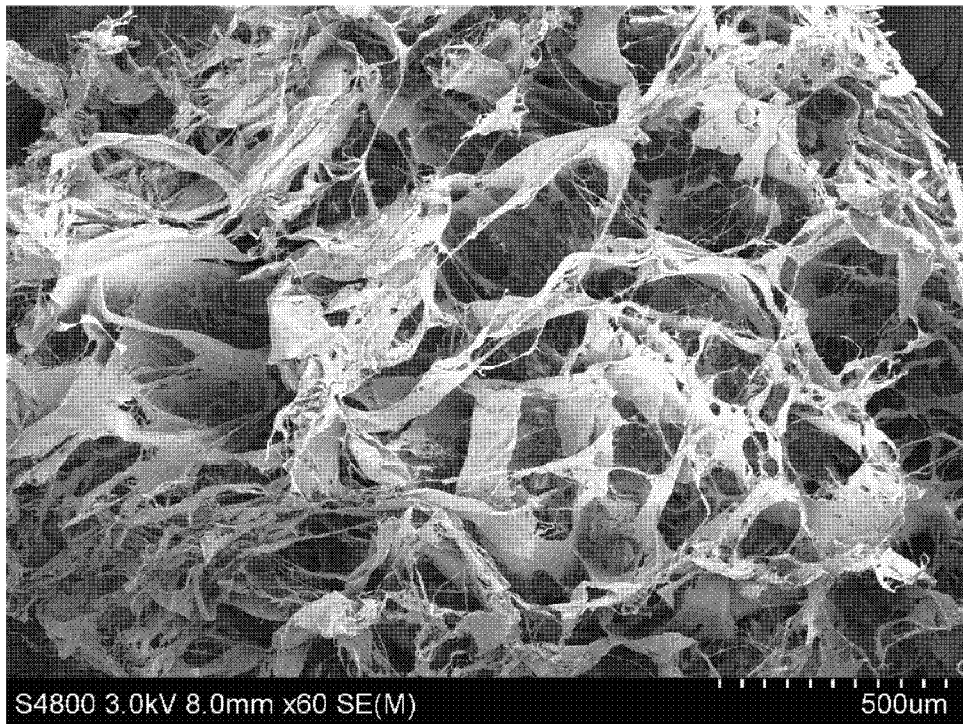


图 4